トマト黄化葉巻病診断キット

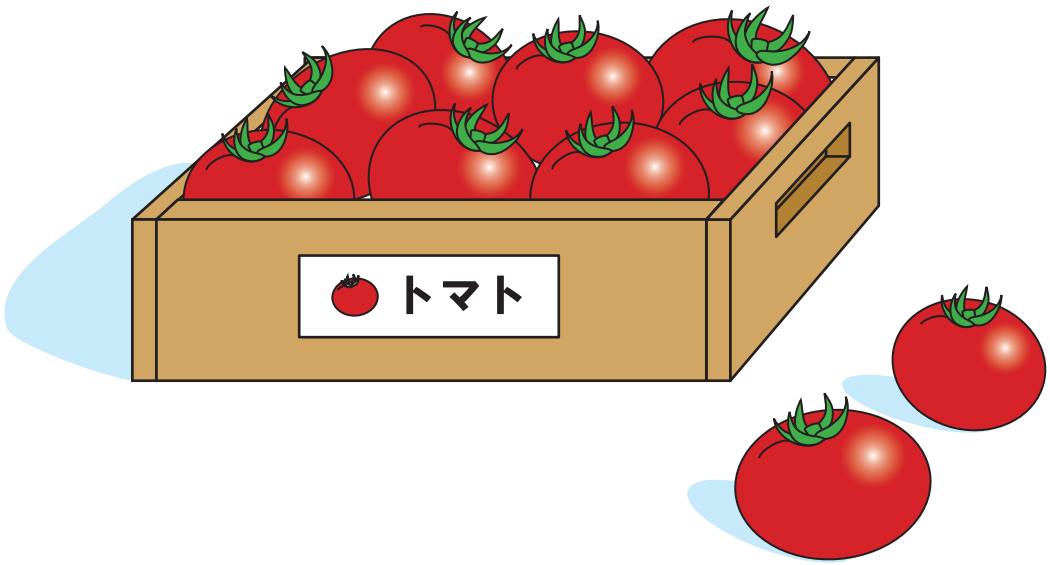
Ver.2

取扱説明書

Version 3. 0. 0

製品コード

NE0021



ニッポン・ジーン

トマト黄化葉巻病診断キット Ver.2
取扱説明書 version 3. 0. 0

【はじめにお読み下さい】

この度は、**トマト黄化葉巻病診断キット Ver.2** をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用して下さい。

使用上の注意

1. 本キットは、トマト黄化葉巻ウイルス検出のための試薬です。医療行為及び臨床診断等の目的では使用できません。

2. **取扱説明書**及び**検査用チューブ**以外の試薬は-20°C の冷凍庫内に遮光して保管し、納品後 6 ヶ月以内に使用して下さい。また、過度の冷却及び試薬の凍結、融解の繰り返しは避けて下さい。

3. 本キットを使用する際は、この取扱説明書の記載内容に従って下さい。記載内容と異なる使用方法及び使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承下さい。

4. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行って下さい。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承下さい。

5. トマト黄化葉巻ウイルスの感染部位、感染レベル、およびウイルス濃度によっては本キットを使用してもウイルスが検出されない場合がありますので、定期的に検査を実施して下さい。また、本キットは補助的に用いる簡易診断キットであるため、確定診断を保証することはできません。

6. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプル及び TYLCV **陽性コントロール**の電気泳動法等による操作及びオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないで下さい。

7. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないで下さい。本キットの安全な取扱については株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照下さい。
   株式会社ニッポンジーン; http://nippongene-analysis.com/

8. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意下さい。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護して下さい。

9. LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、LAMP 法を用いたトマト黄化葉巻病検査用試薬の開発、製造、及び販売を許諾されています。

10. 株式会社富士通システムソリューションズが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムソリューションズまでお問い合わせ下さい。
    株式会社富士通システムソリューションズ
    e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）; http://genome.e-mp.jp/

目次

ページ

1. **キット説明**……1

トマト黄化葉巻病診断キット Ver.2 の概要
トマト黄化葉巻病とその診断
LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法
本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して

2. **キット内容**……2

キット内容

3. **必要な器具、機器、及び試薬**……3

4. **キット使用方法**……5

簡易プロトコル……5
検査を行う前の準備及び注意……7
サンプル
葉の突き方
検査環境
器具、機器の準備
トマト黄化葉巻病診断……11
検査反応
判定

5. **トラブルシューティング**……14

6. **文献・資料**……15

7. **付録**……16

品質管理
系統
他のサンプル調製方法
メモ

1. キット説明

【トマト黄化葉巻病診断キット Ver.2 の概要】

本キットは、LAMP 法を利用してトマト黄化葉巻病の病原体であるトマト黄化葉巻ウイルス（TYLCV; *Tomato yellow leaf curl virus*）を検出するキットです。LAMP 法は SARS（重症急性呼吸器症候群）コロナウイルス感染の診断及びノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便な DNA 増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、LAMP 法によりトマト黄化葉巻ウイルスゲノム DNA の一部を増幅し、増幅の有無からトマト黄化葉巻ウイルスの存在を判定します。

検出に必要な操作は、トマト黄化葉巻ウイルスの保持が疑われるトマト葉およびその他の植物体、媒介虫であるタバココナジラミ等のサンプルを爪楊枝で突き、この爪楊枝を検査溶液（**TYLCV検査液**、**酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に浸して、60～65℃に1時間保温するのみであり、きわめて簡便です。検体中にトマト黄化葉巻ウイルスが存在する場合、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによってトマト黄化葉巻ウイルスゲノムDNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、検体中にトマト黄化葉巻ウイルスが存在しない場合には、DNA増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でトマト黄化葉巻ウイルスを検出することが可能です。

【トマト黄化葉巻病とその診断】

トマト黄化葉巻病は 1990 年代半ばに日本国内に侵入したトマト黄化葉巻ウイルスの感染により引き起こされるウイルス病です。トマト黄化葉巻ウイルスはジェミニウイルス科ベゴモウイルス属に分類され、環状一本鎖 DNA をゲノム DNA として有しています。トマト黄化葉巻ウイルスが感染したトマトは葉の黄化や萎縮による生育不良を起こし、その結果、トマトの収穫量が減少します。現在、様々なウイルス防除対策が講じられておりますが、ウイルスを媒介するタバココナジラミが非常に微少な害虫であり、発見、駆除が困難であることから、ウイルスの拡大を完全に防ぐことは困難な状況となっています。また、2009 年現在、媒介虫の在来系統であるタバココナジラミバイオタイプ B（タバココナジラミ）とは薬剤への抵抗性が異なる、タバココナジラミバイオタイプ Q の分布が拡大しており、ウイルス防除対策をさらに困難にしています。

その中で、ELISA（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）法や PCR（Polymerase Chain Reaction）法を用いたトマト黄化葉巻ウイルス検出技術が開発されましたが、ELISA 法およびそれに準ずるイムノクロマトグラフィー法は抗血清や抗体を必要とする上に、検出感度が低く偽陽性、偽陰性に問題を残しています。現在では、PCR 法による DNA 増幅反応がウイルス検出に妥当な手段とされていますが、PCR 法は最低でも 2 段階の温度変化の繰り返しを必要とする上、判定には電気泳動による DNA の分離操作が不可欠であり、診断分野への応用においてその繁雑な操作に問題を残していました。

【LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応及び簡易検出が可能である等の利点を有しています。LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照下さい。

栄研化学株式会社
Eiken GENOME SITE; http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンイージーティーが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンイージーティーホームページをご参照下さい。

株式会社ニッポンイージーティー; http://www.n-egt.com/

2. キット内容

【キット内容】

試薬名 （帯ラベル）	頭部ラベル色	内容量 10 テスト用	保管温度
取扱説明書	−	1 部	室温
検査用チューブ	−	10 本	室温
TYLCV 検査液	赤色	230 µl	−20˚C
酵素液	黄色	10 µl	−20˚C
蛍光発色液	紫色	10 µl	−20˚C
TYLCV 陽性コントロール	灰色	5 µl	−20˚C
ミネラルオイル	青色	400 µl	−20˚C

取扱上の注意

* **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用して下さい。

* **取扱説明書**、**検査用チューブ**以外の試薬は−20˚C で遮光して保管し、納品後 6 ヶ月以内に使用して下さい。

* 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20˚C で保管して下さい。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保管して下さい。

* **酵素液**を室温或いは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却により凍結させたりしないようご注意下さい。酵素の働きが低下する可能性があります。

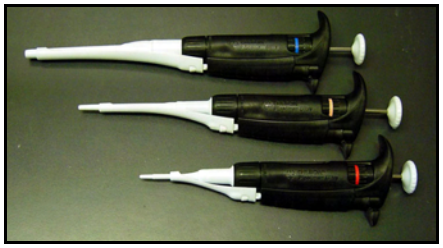
* **TYLCV 陽性コントロール**には、トマト黄化葉巻ウイルスゲノム DNA に特徴的な配列が含まれています。

3. 必要な器具、機器、及び試薬

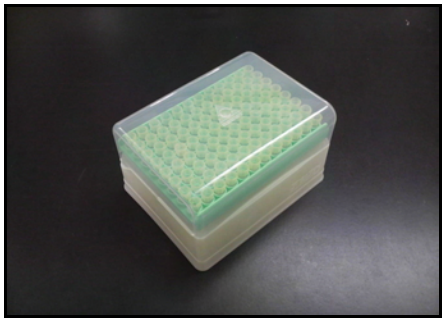
* フィルター付マイクロチップ、チューブラック、フロートプレートがセットになった**診断キットスターターセット**（製品コード： NE0051）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムソリューションズまでお問い合わせ下さい。

【必ずご準備頂く器具、機器】

● マイクロピペット
(0.5–10 µl、10–100 µl、200–1,000 µl)



● フィルター付マイクロチップ（滅菌済）



● 1.5 ml チューブ

● 使い捨て手袋

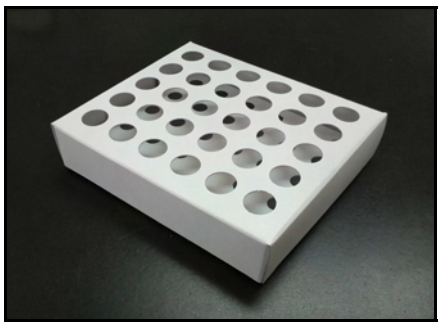
● 木製の爪楊枝

● インキュベーター（恒温器）
ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、60～65°Cの温度を保持する機器が必要です。

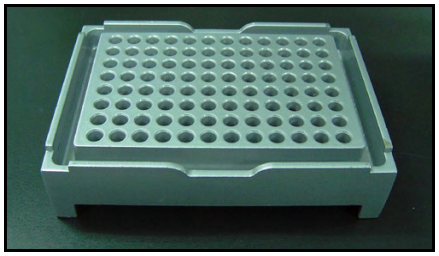
【その他の器具、機器、及び試薬】

下記の器具、機器、及び試薬は本キットの使用に必須ではありませんので、必要に応じてご準備下さい。

● チューブラック



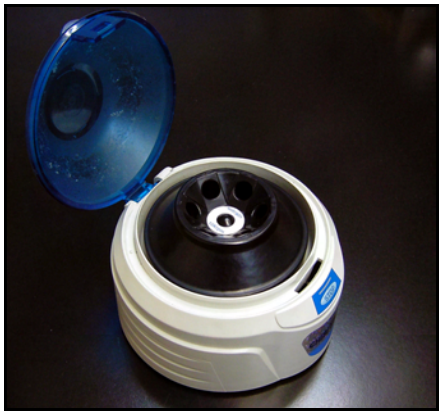
● アルミラック或いはプレートラック



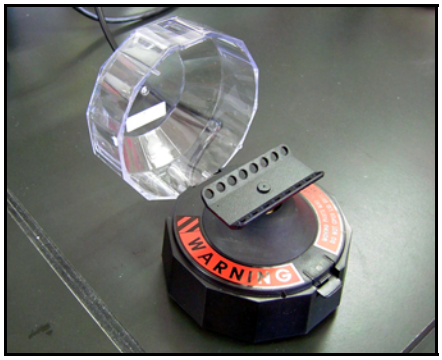
- UV 照射装置
  蛍光発色液による検出の際に使用します。240–260 nm 或いは 350–370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。

- ボルテックスミキサー

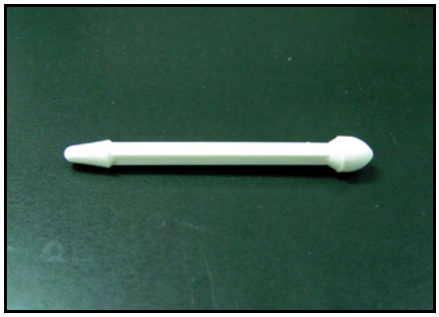
- 簡易遠心機（1.5 ml チューブ用）



- 簡易遠心機（0.2 ml チューブ用）



- 磨砕用ペッスル



- 防護用ゴーグル或いはフェイスシールド
- フロート
- ピンセット
- 氷（クラッシュアイス）
- サンプル採取用ビニールパック
- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液

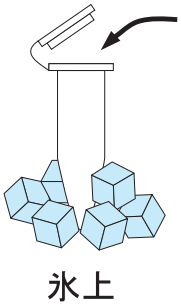
4. キット使用方法

【簡易プロトコル】

＊　本キットの詳細な使用方法に関しては 7 ページ以降を参照して下さい。

簡易プロトコル

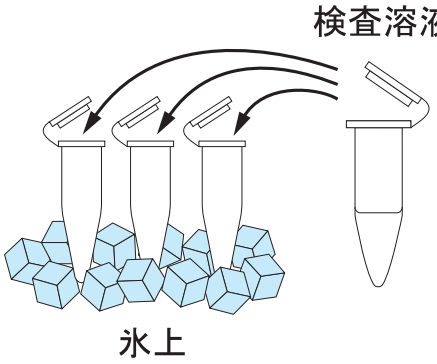
1　検査溶液を必要量まとめて作製する



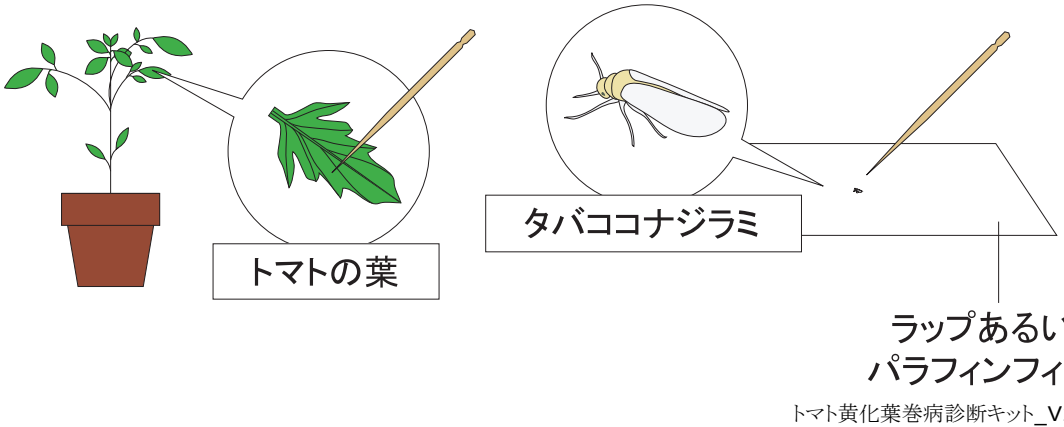
試薬	1テスト	5テスト	10テスト
TYLCV検査液	23 µl	115 µl	230 µl
蛍光発色液	1 µl	5 µl	10 µl
酵素液	1 µl	5 µl	10 µl
合計	25 µl	125 µl	250 µl

＊分注時の液量の不足を防ぐため、1～2テスト分程度多めに作製する。

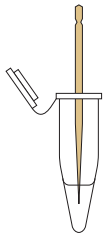
2　検査溶液を1テストあたり25 µlずつ分注する



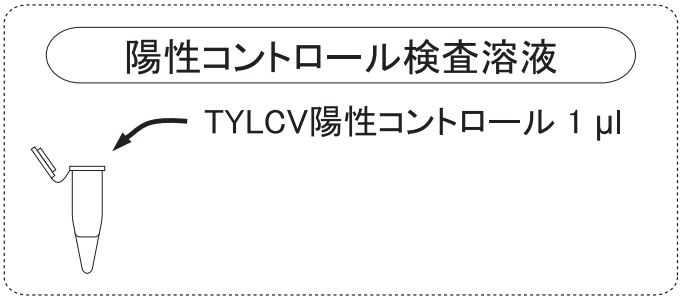
3　サンプルを爪楊枝で突く



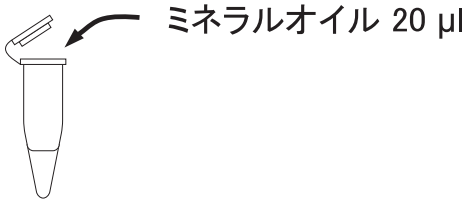
4	前工程の爪楊枝を検査溶液に浸す



検査溶液



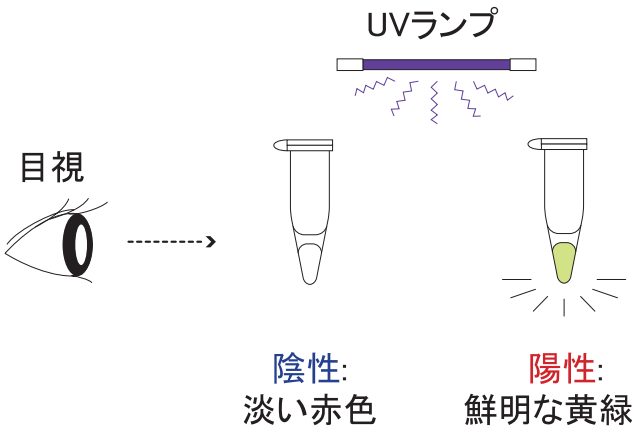
5	ミネラルオイルを入れる

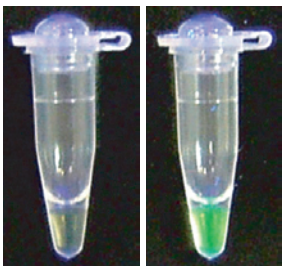


6	63℃、1時間

7	80℃、2分間

8	判定





検査を行う前の準備及び注意

【サンプル】

■　コントロール

本キットには、検査の成否を確認するための **TYLCV 陽性コントロール**が添付されています。必要に応じて、**TYLCV 陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」及び **TYLCV 陽性コントロール**を添加しない「陰性コントロール検査溶液」を作製して下さい。

■　サンプルの準備

圃場において診断を実施する場合、トマト黄化葉巻ウイルスの保持が疑われるトマトその他の植物体の一部（トマトの場合、頂芽あるいは頂芽から2枚目の葉）を爪楊枝で突き、爪楊枝を清潔なビニールパック等に回収します。このとき、汚染や誤判定を防ぐため、爪楊枝同士が接触しないよう、必ず 1 本ずつ別々に保管して下さい。また、サンプルの採取においては必ず使い捨て手袋を着用し、もし爪楊枝の先端に手指が接触した場合は手袋を交換して下さい。この爪楊枝の先端にはサンプルが付着しており、直接検査に用いることが可能です。

トマトその他の植物体の一部（葉や茎等）を採取してビニールパック等に回収し、同様に爪楊枝で突いて検査をおこなうことも可能です。枯死したサンプルからの検査も可能ですが、安定な結果を得るために、新鮮なサンプルを採取して下さい。また、病徴が認められないトマトの葉にもトマト黄化葉巻ウイルスが潜伏している場合がありますので、葉をよく観察し、疑わしい葉から検査を行って下さい。なお、無病徴のトマト黄化葉巻ウイルス抵抗性品種においても感染が認められる場合があります。

タバココナジラミをサンプルとする場合は、タバココナジラミを密封できる容器に捕獲し、適当量の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 或いは滅菌水を検体に滴下して飛散を防止してから爪楊枝で突いて検査を行って下さい。黄色粘着板に付着したタバココナジラミを爪楊枝で突いて検査をおこなうことも可能ですが、粘着液が多量に混入するとトマト黄化葉巻ウイルスの存在の有無に関わらず、検査溶液が発色することがありますので、ご注意下さい。

サンプルの準備においては、他の栽培環境にトマト黄化葉巻ウイルスが拡大しないよう、各施設における適切な措置を執って下さい。特に、トマト施設間におけるタバココナジラミの移動が発生しないよう、作業用の着衣および器具への付着には十分注意し、防虫ネットや薬剤の使用、着衣の交換による防除を徹底して下さい。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みの爪楊枝およびビニールパック、検査後サンプル等は二重にしたビニール袋にまとめて廃棄して下さい。また、オートクレーブ高圧滅菌処理は行わないで下さい。

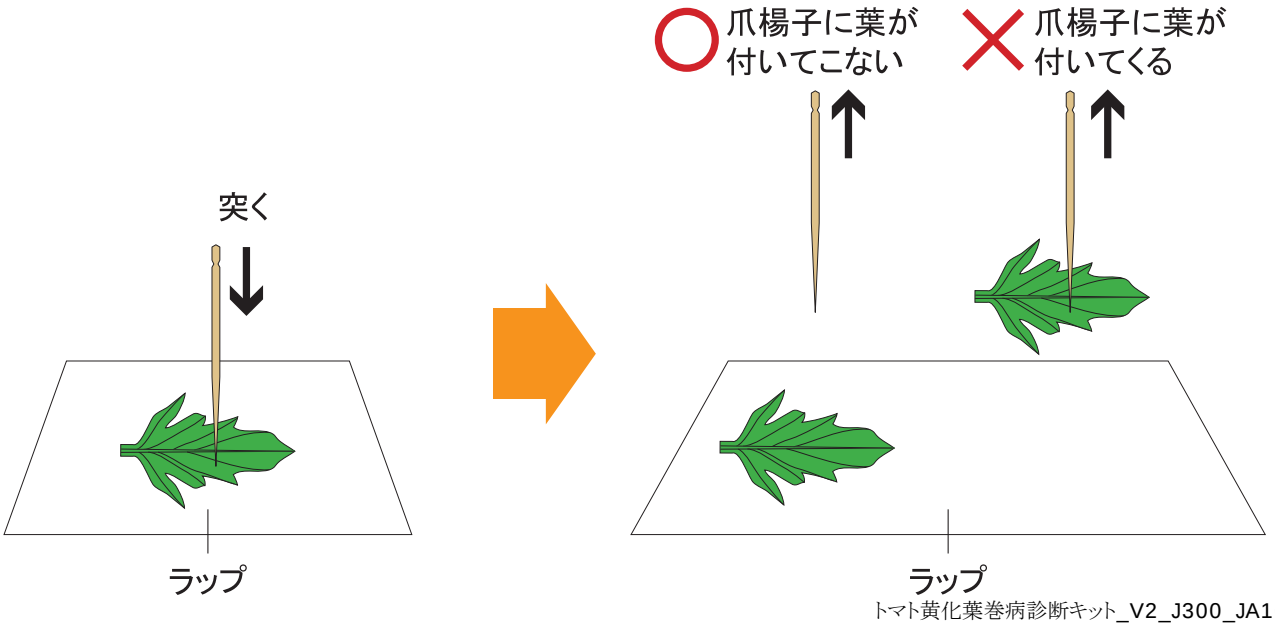
【葉の突き方】

葉の突き方

サンプル採取時に、トマトの葉を貫通させないでください。サンプルの過剰な持ち込みは、偽陽性の原因となります。

偽陽性が疑われる場合には、下記のように堅い台の上にラップを敷き、ラップの上に置いた葉を爪楊枝で軽く突いて、再度検査を行って下さい。

注意 突いた爪楊枝に葉が付いてこない程度の強さで葉を突いて下さい。



【器具、機器の準備】

■　インキュベーター（恒温器）

インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、温度を 63°C に設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認して下さい。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行って下さい。

■　器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻して下さい。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻して下さい。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択して下さい。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択して下さい。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用して下さい。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保して下さい。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換して下さい。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意して下さい。

【検査環境】

LAMP 法は高感度な DNA 増幅技術であるため、検査環境に **TYLCV 陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型 DNA となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取扱においては、作業用の着衣及び器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底して下さい。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄して下さい。また、検査後サンプル及び **TYLCV 陽性コントロール**の電気泳動法等による操作及びオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないで下さい。

■　作業区域

核酸抽出及び核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチ或いは作業台を試薬調製作業区域とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製して下さい。試薬調製作業区域では **TYLCV 陽性コントロール**及び LAMP 法において鋳型 DNA となる核酸を含む検体の取扱は行わないで下さい。

検査溶液へのサンプル及び **TYLCV 陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けて下さい。

■　核酸除去操作

器具は常に清潔に保って下さい。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよく濯ぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意して下さい。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意して下さい。

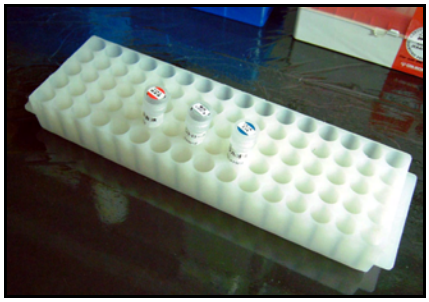
＜方法＞

i)　使い捨て手袋を装着します。
ii)　有効塩素濃度 10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii)　次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv)　非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よく濯いで乾燥します。
v)　作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

トマト黄化葉巻病診断

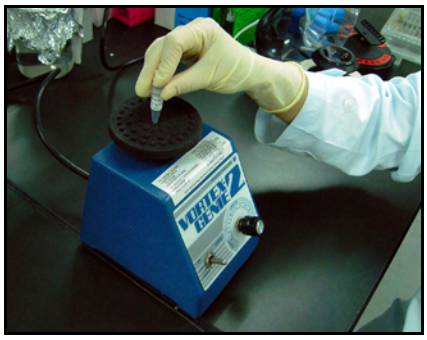
1. 検査反応

1-1. 試薬の融解



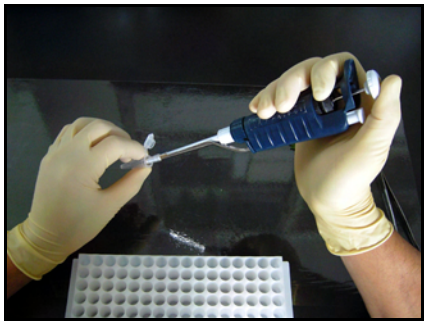
TYLCV 検査液、**TYLCV 陽性コントロール**、**ミネラルオイル**を取り出し、室温で完全に融解します。**酵素液**及び**蛍光発色液は**-20°C では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

1-2. 混合とスピンダウン



チューブを数回軽く叩く（以下タッピング）或いはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の撹拌により混合し均一とした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

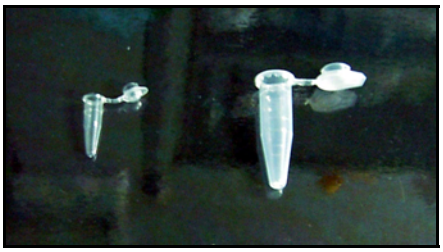
1-3. 検査溶液の作製



1.5 ml チューブに下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピング或いはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量＞

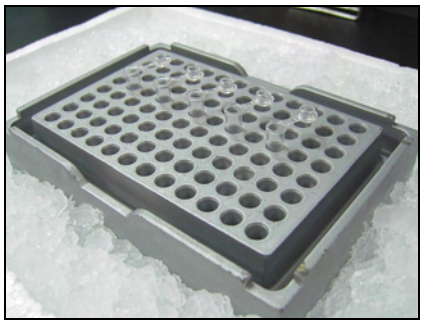
試薬	1 テスト分	5 テスト分	10 テスト分
TYLCV 検査液	23.0 µl	115.0 µl	230.0 µl
蛍光発色液	1.0 µl	5.0 µl	10.0 µl
酵素液	1.0 µl	5.0 µl	10.0 µl
検査溶液合計	25.0 µl	125.0 µl	250.0 µl



重要

- 検査溶液作製の際は**検査用チューブ**を使用せずに、検査溶液作製用滅菌チューブ（写真右）を別途ご用意ください。
- 検査溶液は、コントロール検査溶液を含めた 3 テスト分以上をまとめて作製してください。また、分注時の液量の不足を防ぐため、1～2 テスト分程度多めに作製してください。

1-4. 検査溶液の分注

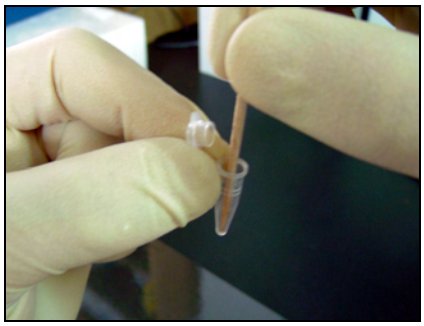


核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロック或いはプレートラックに立て、検査溶液を 25.0 µl ずつ分注します。

重要

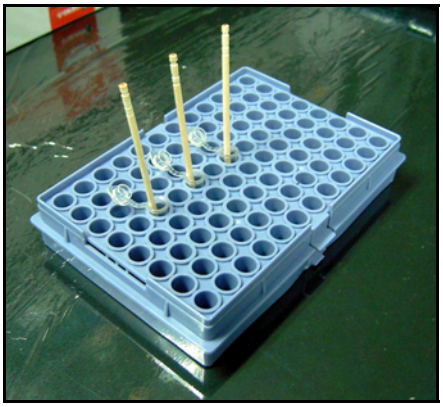
本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、及び材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないで下さい。

1-5. サンプルの添加



サンプルが付着した爪楊枝を検査溶液に浸します（8 ページを参照してください）。最後に **TYLCV 陽性コントロール** 1.0 µl を陽性コントロール検査溶液のチューブに添加しますが、陰性コントロール検査溶液のチューブにはサンプルも**陽性コントロール**も添加しないままにします。

すべてのサンプルを添加した後、各チューブに**ミネラルオイル** 20.0 µl を添加します。



重要

- 爪楊枝を浸した状態で放置すると検査溶液を吸収するため、検査溶液の液量が減少し、判定が困難になります。サンプルを添加した後は爪楊枝を検査溶液中に放置しないよう、ご注意ください。

- ミネラルオイルを添加しなかった場合、蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が著しく低下します。検査の際はキット添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。

1-6. 検査反応

ヒートブロック

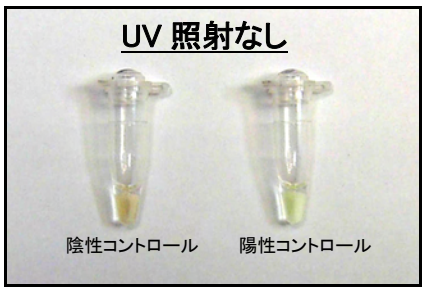
全てのキャップを閉じた状態でタッピング或いはボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、サーマルサイクラー、インキュベーター、或いはウォーターバスとフロートを用いて 63°C で 1 時間保温します。

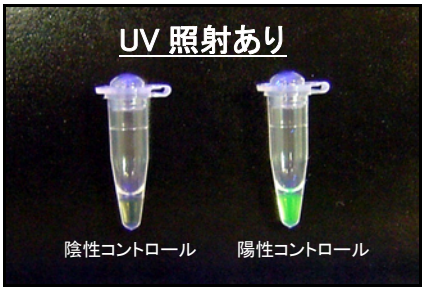
原則として、検査反応は 1 時間以上行わないで下さい。

フロート

2. 判定

2-1. 検査の成否の判定





1 時間経過後、80°C で 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UV を照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途 UV 照射装置（240–260 nm 或いは 350–370 nm の波長を出力）及び防護用ゴーグル或いはフェイスシールドが必要になります。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意下さい。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認して下さい。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明して下さい。

重要

本キットでは、検査結果の判定は 1 時間が経過した時点で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行って下さい。

2-2. サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認して下さい。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、検体中にトマト黄化葉巻ウイルスが存在する可能性があります。

＜判定のポイント＞

明確な蛍光の発色が認められるサンプル

「**トマト黄化葉巻ウイルス陽性**」と判定します。仮に蛍光の発色が微弱である場合でも、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められるサンプルはすべて「**トマト黄化葉巻ウイルス陽性**」と判定してください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

「**トマト黄化葉巻ウイルス陰性**」と判定します。ただし、感染初期の植物体においてはウイルス濃度が低く、蛍光の発色が認められない場合がありますので、本キットを用いた検査において「**トマト黄化葉巻ウイルス陰性**」と判定され、病徴も認められない植物体についても、感染の疑いがある場合は 10 日間以上経過してから再度検査を実施してください。

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処して下さい。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせ下さい。

問題点	原因及び対処法
検査溶液が緑色を呈して判定が困難である	**A. 葉サンプルの持ち込み量が過剰である。** 本キットはきわめて高感度ですので、葉を突いた爪楊枝の先端が緑色にならない程度で検査が可能です。過剰なサンプルの持ち込みは偽陽性の原因となりますので、ご注意下さい。
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. TYLCV 陽性コントロールの添加量が過剰である。** **TYLCV 陽性コントロール**の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。**TYLCV 陽性コントロール**の添加量は取扱説明書の指示に従って下さい。 **B. 試薬或いは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型 DNA となる核酸の混入が疑われます。試薬及び検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施して下さい。 **C. キレート化合物或いは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意下さい。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認して下さい。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行って下さい。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色或いは消光が起こり、誤判定の原因となります。保管及び取扱は本取扱説明書の指示に従って下さい。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付のミネラルオイルを必ず添加して下さい。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240–260 nm 或いは 350–370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意下さい。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行って下さい。 **B. 保管中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じて下さい。
蛍光発色液の発色による判定が困難である	**A. 別の方法でサンプルを準備して下さい。** 明確な結果が得られない場合、以下のいずれかの方法でサンプルを準備し、1 µl を検査溶液に添加して検査を行って下さい (16 ページの【他のサンプル作製方法】を参照して下さい)。 1. 1.5 ml 滅菌チューブに 50～500 µl の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を入れ、サンプルを突いた爪楊枝を懸濁してサンプルとします。 2. 感染が疑われるトマト葉およびその他の植物体約 50 mg を 1.5 ml 滅菌チューブに入れ、0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液 100 µl を添加して磨砕用ペッスルを用いて磨砕します。5 µl を新しい 1.5 ml 滅菌チューブに移し、495 µl の 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を添加して中和したものをサンプルとします。 3. 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) あるいは滅菌水を滴下したタバココナジラミをパラフィンフィルム、ラップ等の上で磨砕用ペッスルを用いて擦り潰し、サンプルとします。

6. 文献・資料

1. Fukuta S, Kato S, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. (2003) Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J Virol Methods*. **112** (1-2), 35

2. 福田 至朗、吉田 桂子、神戸 三智雄 (2003) LAMP 法によるトマト黄化葉巻ウイルス検出技術の開発 ブレインテクノニュース **112** (1-2), 35

3. 福田 至朗、穴井 尚子、加藤 政司、吉村 幸江、深谷 雅博、矢部 和則、大矢 俊夫、神戸 三智雄 (2005) 簡易な鋳型調製による loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出 関西病虫害研究会報

4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **28** (12): e63

5. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

7. 付録

【品質管理】

キット添付の **TYLCV 陽性コントロール** 1.0 µl を検定用サンプルとする品質管理試験において、25 µl (1 テスト分) のスケールで DNA 増幅反応を行い、63°C、1 時間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

【系統】

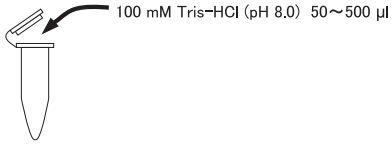
LAMP 法は 4 から 6 種類のプライマーを必要とする方法です。本キットに含まれるプライマーはトマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV; *Tomato yellow leaf curl virus*) のゲノム DNA の塩基配列のうち、以下の各系統によく保存された領域をもとに設計されています。

GenBank Accession No.	系統名
AB014347	TYLCV-Aichi (愛知県)
AB116633	TYLCV-Atu (愛知県)
AB014346	TYLCV-Shizuoka (静岡県)
AB110218	TYLCV-Israel Sz (静岡県)
AB116632	TYLCV-SzY (静岡県)
AB116635	TYLCV-SzD (静岡県)
AB116636	TYLCV-SzOs (静岡県)
AB116634	TYLCV-Kis (三重県)
AB110217	TYLCV-Israel Ng (長崎県)
AB116630	TYLCV-Omu (長崎県)
AB116629	TYLCV-Miy (宮崎県)
AB116631	TYLCV-Mis (熊本県)
AB192965	TYLCV-Tos (高知県)
AB192966	TYLCV-Tos (H) (高知県)
AY530931	TYLCV-Florida
NC_004005	TYLCV-Alm
AJ489258	TYLCV-Almeria
AJ223505	TYLCV-Cuba
AF024715	TYLCV-Dominican
AY594174	TYLCV-Egypt
AJ132711	TYLCV-Iran
AF105975	TYLCV-Portugal
AY134494	TYLCV-Puerto Rico
AJ865337	TYLCV-Reunion
AF071228	TYLCV-Spain7297
X61153	TYLCV-Sardinia V

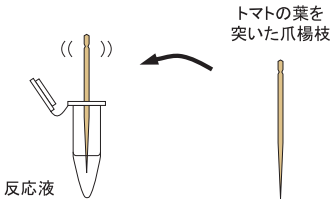
【他のサンプル作製方法】

爪楊枝懸濁法

100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を入れる

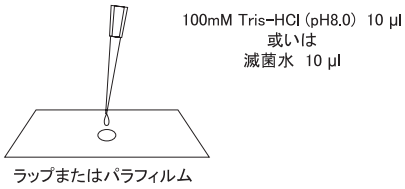


トマトの葉を突いた爪楊枝を懸濁する

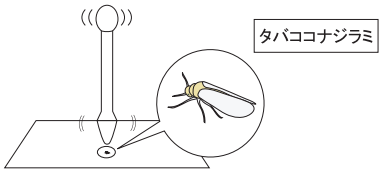


媒介虫磨砕法

100 mM Tris-HCl (pH8.0) 或いは
滅菌水を滴下する

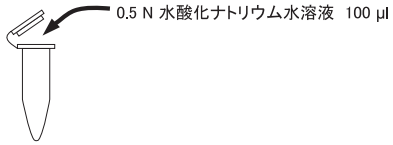


タバココナジラミを置いて磨砕用
ペッスルで擦り潰す

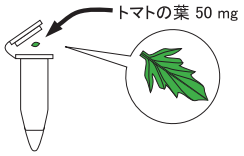


アルカリ磨砕法

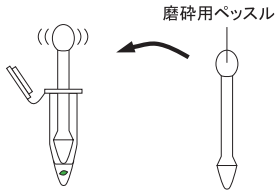
0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液を入れる



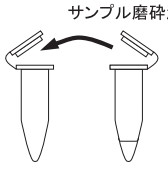
トマトの葉を入れる



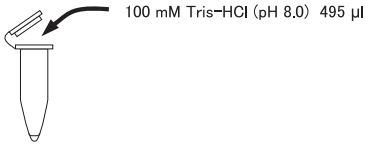
磨砕用ペッスルで擦り潰す



新しいチューブへ磨砕液5 µlを移す

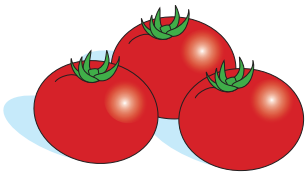


100 mM Tris-HCl (pH 8.0) を入れて中和する



【メモ】

ニッポン・ジーン



・記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
・本取扱説明書の記載内容は2009年6月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページから
ダウンロードして下さい。
・「ニッポンジーン」及び「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
・その他、製品名等の固有名詞は各社の商標或いは登録商標です。
・記載内容及び写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン

TEL 076-451-6548
FAX 076-451-6547
E-mail support@nippongene-analysis.com
URL http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先

株式会社富士通システムソリューションズ

TEL 03-5322-5424
FAX 03-5908-1538
E-mail fsol-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL http://genome.e-mp.jp

Copyright (C) 2009 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved.